Vet. Med. Assoc. 2007. Vol. 230, N. 2. P. 244-250.
11. Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs / J. Kim, Y. Ha, K. Jung [et al.] // Can. J. Vet. Res. 2004. Vol. 68. P. 218-221.
12. Jasbir, S. Porcine circovirus type 2 in Malaysian pigs – recent findings / S. Jasbir, T.G. Nisha, P. Y. Choo // 19th Veterinary Association Malaysia Congress, 3–5 August 2007. P. 109–111.
13. Kim, J. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex / J. Kim, H.-K. Chung, C. Chae // Vet. J. 2003. Vol. 166. P. 251-256.
14. Kim, J. Potentiation of porcine circovirus 2–induced postweaning multisystemic wasting syndrome by porcine parvovirus Is associated with excessive production of tumor necrosis factor-a / J. Kim, Y. Ha, C. Chae // Vet. Pathol. 2006. Vol. 43, N 5. P. 718–725.
15. Larochelle, R. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome / R. Larochelle, R. Magar, S. D'Allaire // Can. J. Vet. Res. 2003. Vol. 67. P. 114-120.
16. PMWS: experimental model and co-infections/ G. Allan, F. McNeilly, S. Krakowka [et al.] // Vet. Microbiology. 2004. Vol. 98. P. 165–168.
17. Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field / J. Ellis, E. Clark, D. Haines [et al.] // Vet. Microbiology. 2004. Vol. 98. P. 159–163.
18. Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms / J. Kim, H-K. Chung, T. Jung [et al.] // J. Vet. Med. Sci. 2002. Vol. 64. P. 57-62.
19. Risk factors for porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in 149 French farrow-to-finish herds / N. Rose, G. Larour, G. Le Diguerher [et al.] // Prev. Vet. Med. 2003. Vol. 61. P. 209–225.
20. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus / S. Krakowka, J. Ellis, B. Meehan [et al.] // Vet. Pathol. 2000. Vol. 37, N 3. P. 254–263.

УДК 619:579.843.95:616-079.4:616-002.4

М. А. Шибаев

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ВЫЯВЛЕНИЯ *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA* С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ И НУКЛЕОТИДНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Введение

Рост числа респираторных заболеваний крупного рогатого скота является острой проблемой во всем мире. Комплекс респираторных заболеваний КРС чаще всего представляет полиэтиологические инфекционные процессы, в которых на разных стадиях развития патологии принимают участие инфекционные агенты как вирусной, так и бактериальной этиологии [1, 2].

Mannheimia haemolytica (ранее *Pasteurella haemolytica*) – грамотрицательная бактерия, принадлежащая к порядку *Pasteurellales*, к семейству *Pasteurellaceae*, роду *Mannheimia* [4]. Она является важнейшим этиологическим бактериальным агентом в комплексе респираторных заболеваний КРС, вызывающим развитие манхемиоза (также известный как транспортная лихорадка КРС или пастереллезная пневмония). При этом развивается особая форма инфекционной фибринозно-гнойной альвеолярной бронхопневмонии [3]. Этому в большей степени способствуют факторы патогенности различной природы, такие, как полисахаридная капсула, фимбрии, нейроминидаза и токсины (эндотоксин или липополисахарид и лейкотоксин) [5, 6, 7]. В отсутствие средств антибактериальной терапии данное заболевание может приводить к гибели животного.

Несмотря на разнообразие существующих диагностических методов, проблема идентификации и дифференциации *Mannheimia haemolytica* остается чрезвычайно актуальной. Наиболее широко применяемыми методами лабораторной диагностики для выявления данного микроорганизма являются: метод культивирования на питательных средах и серологические анализы [9, 11, 12]. Однако эти методы не всегда обладают достаточной чувствительностью и специфичностью.

Методы лабораторной диагностики на основе молекулярной биологии, такие, как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и секвенирование амплифицированного участка генома, обладают высокой чувствительностью и специфичностью. Однако ранее разработанные методы на основе ПЦР для выявления *Pasteurella haemolytica* КРС в настоящее время требуют пересмотра методических приемов в соответствии с требованиями современной систематики представителей семейства *Pasteurellaceae* [13].

Целью исследования явилась разработка метода на основе ПЦР и нуклеотидного секвенирования, позволя-

ющего выявлять и дифференцировать *Mannheimia haemolytica* в патологическом материале от КРС.

Материалы и методы

Нуклеотидные последовательности генов lktC, lktD и SodA микроорганизмов *M. haemolytica, M. glucosida, Pasteurella trehalosi, Mannheimia varigena, Mannheimia ruminalis, Mannheimia granulomatis* и др. были получены из компьютерной базы данных Genbank. Анализ последовательностей и выбор праймеров проводили с помощью пакета программ «BioEdit Sequence Alignment Editor» (Hall T.A., версия 7.0.5.2, 2005) и программы «OLIGO» (версия 4.0).

В работе были использованы культуральный штамм №169 (серогруппа А) *Pasteurella haemolytica* с титром 10^{10} КОЕ/мл и *Pasteurella multocida* штамм № 656 серовариант В:6 и штамм № 9 серовариант D:3, полученные из музея ФГУ «ВГНКИ». Также был использован *Pasteurella multocida* штамм № 11039 серовариант А:1, полученный из Американской коллекции типовых культур (АТСС).

Также были использованы ранее нами выявленные *Chlamydophila pecorum, Mycoplasma, Salmonella, E. coli, Streptococcus, Haemophilus* и *Campylobacter*.

Суммарную ДНК из культуральной бактериосодержащей суспензии и патологического материала от животных выделяли с использованием универсального набора реагентов для пробоподготовки Биоком, в соответствии с инструкцией к набору.

Полимеразную цепную реакцию осуществляли в реакционной смеси следующего состава: 3 мкл кДНК, по 10 пмоль праймеров, 2 мМ MgCl2, 200 мкМ каждого dNTP, 1,25 ед. Taq ДНК-полимеразы, 2,5 мкл 10x буфера для Taq-полимеразы и деионизированная вода до объема 25 мкл. Амплификацию проводили при следующих временных и температурных режимах:

- один цикл 4 мин при 90° С;
- сорок циклов: 30 с при 94° С, 30 с при 60° С и 30 с при 72° С;
- один цикл 5 мин при 72° С.

Продукты реакции анализировали методом электрофореза в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия.

Пробу, содержащую амплифицированную ДНК, переносили в 1,5 мл пробирку, добавляли 200-300 мкл 4М гуанидинтиоционат (ГТЦ) и перемешивали. Смесь пропускали через стекловолокнистые фильтры GF/F, используя вакуумный коллектор и фильтры с сорбированной на них ДНК, промывали 80% этанолом. Остатки этанола удаляли центрифугированием при 10 тыс. g в течение 30 с. После этого на фильтры наносили 50 мкл деионизированной воды и центрифугировали 10-15 с при 10 тыс. g.

Секвенирование продуктов ПЦР проводили с помощью автоматического секвенатора (ABI Prism 3100).

Результаты и обсуждение

Одной из основных преград, лежащих на пути разработки ПЦР для выявления и дифференциации *M. haemolytica*, является сложность его дифференцирования от других видов рода *Mannheimia*, нуклеотидные последовательности генов которых обладают высокой степенью консервативности с аналогичными генами *M. haemolytica*.

Также надо отметить, что возможность разработки ПЦР для выявления *M. haemolytica* ограничивается малым количеством нуклеотидных последовательностей генов данного микроорганизма, с помощью которых можно было бы дифференцировать его от других видов рода *Mannheimia*.

Поэтому для выбора наиболее консервативного участка генома *M. haemolytica* с целью повышения степени специфичности метода необходимо было провести анализ наибольшего количества нуклеотидных последовательностей генов всех представителей рода *Mannheimia*.

Учитывая тот факт, что гены лейкотоксина lktC, lktA, lktB и lktD присутствуют только у представителей рода *Mannheimia* [8, 10] и имеют большую клиническую важность, логично было в первую очередь провести анализ нуклеотидных последовательностей данных генов.

Анализ нуклеотидных последовательностей генов лейкотоксина показал, что ген lktC является наиболее консервативным для рода *Mannheimia*. К тому же наличие достаточно представительной выборки нуклеотидных последовательностей данного гена позволило нам использовать его для выбора родо-специфических праймеров. Всего было проанализировано 27 нуклеотидных последовательностей гена lktC, депонированных в базе данных Genbank. Из них 14 – *Mannheimia haemolytica, 6 – Mannheimia glucosida, 4 – Pasteurella trehalosi* и по одной нуклеотидной последовательности *Mannheimia varigena, Mannheimia ruminalis, Mannheimia granulomatis*.

Тем не менее ген lktC не несет генетической информации о видовых отличиях рода *Mannheimia* и, таким образом, не является оптимальной мишенью для диффе-

ренциации *M. haemolytica* от других представителей данного рода.

Для разработки эффективного метода дифференциации *M. haemolytica* от других видов рода *Mannheimia* необходимо в первую очередь дифференцировать его от наиболее генетически близкого к нему вида - *Mannheimia glucosida*. Для этого нами были сконструированы праймеры на гене lktD. Секвенирование продукта ПЦР и последующее определение первичной структуры амплифицированного участка генома позволяют дифференцировать *M. haemolytica* и *Mannheimia glucosida*. Для этого было проанализировано 22 нуклеотидных последовательности гена lktD, депонированных в базе данных Genbank. Из них 10 – *Mannheimia haemolytica*, 7 – *Mannheimia glucosida*, 4 – *Pasteurella trehalosi* и одна нуклеотидная последовательность *Mannheimia ruminalis*.

Из-за отсутствия в Genbank нуклеотидных последовательностей гена lktD других видов рода *Mannheimia* невозможно было провести сравнительный анализ их нуклеотидных последовательностей.

Для этой цели нами был выбран ген sodA, нуклеотидные последовательности которого обладают высокой степенью консервативности для штаммов *M. haemolytica* и *M. glucosida* и одновременно достаточной вариабельностью с другими видами рода *Mannheimia*. Были сконструированы 2 праймера, фланкирующие данный ген, которые были использованы затем в ПЦР. Секвенирование продукта данной ПЦР и определение первичной структуры амплифицированного участка генома окончательно позволяют дифференцировать *M. haemolytica* от других видов *Mannheimia*. Всего было проанализировано 54 нуклеотидных последовательности гена sodA, депонированных в базе данных Genbank. Из них 2 – *Mannheimia haemolyt*ica, 2 – *Pasteurella trehalosi*, 2 – *Pasteurella multocida*, 5 – *Pasteurella canis,* 5 – *Pasteurella stomatis*, 3 – *Pasteurella pneumotropica*, 3 – *Pasteurella dagmatis*, 3 – *Pasteurella bettyae*, 2 – *Haemophilus influenzae*, 2 – *Gallibacterium anatis*, 2 – *Haemophilus haemolyticus* и по одной нуклеотидной последовательности *Mannheimia varigena*, *Mannheimia ruminalis, Mannheimia granulomatis, Mannheimia glucosida, Pasteurella canis, Avibacterium avium, Avibacterium volantium, Pasteurella langaaensis, Pasteurella aerogenes, Avibacterium paragallinarum, Actinobacillus actinomycetemcomitans, Pasteurella testudinis, Haemophilus parasuis, Haemophilus paraphrophilus, Haemophilus paracuniculus, Haemophilus haemoglobinophilus, Haemophilus felis, Haemophilus aphrophilus, Haemophilus parainfluenzae.*

Таким образом, для выявления генома

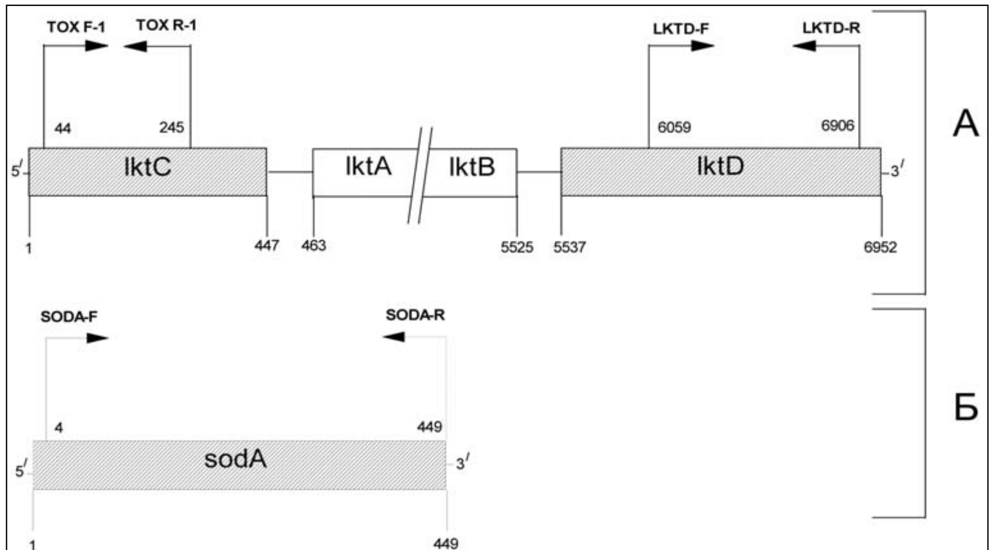


Рис. 1. Расположение праймеров на геноме *M. haemolytica*
А: Расположение праймеров на генах lktC и lktD; нумерация нуклеотидов соответствует нуклеотидной последовательности штамма PH2 *M. haemolytica* (номер доступа в Genbank AF314503);
Б: Расположение праймеров на гене sodA; нумерация нуклеотидов соответствует нуклеотидной последовательности штамма CIP 103426 *M. haemolytica* ATCC 33396 (номер доступа в Genbank AY702512)

Таблица

Нуклеотидные последовательности праймеров

Наименование праймеров	Первичная структура праймеров	Локализация праймеров
TOX F-1	5'–TGATTCCTGCAATTGAAAATGAACAATATA–3›	44 – 73[1]
TOX R-1	5'–GCCGTTTCTTCTTACATTTTAGCCCA–3›	220 – 245[1]
SODA-F	5'-TTCGATGCTAAAACAATGGAAATCC-3'	4 – 28[2]
SODA-R	5'-AAGACTAAAATCGGATAGCCTGAAACG-3'	423 – 448[2]
LKTD-F	5'-TTTAAAGATTCATCGGAAGAAGATCGA-3'	6059 – 6085[1]
LKTD-R	5'-CGTTCACCGGTTTTGATTTCAGC-3'	6884 – 6906[1]

1 – соответствует нуклеотидной последовательности штамма PH2 *M. haemolytica* (номер доступа в Genbank AF314503);
2 – соответствует нуклеотидной последовательности штамма CIP 103426 *M. haemolytica* ATCC 33396 (номер доступа в Genbank AY702512)

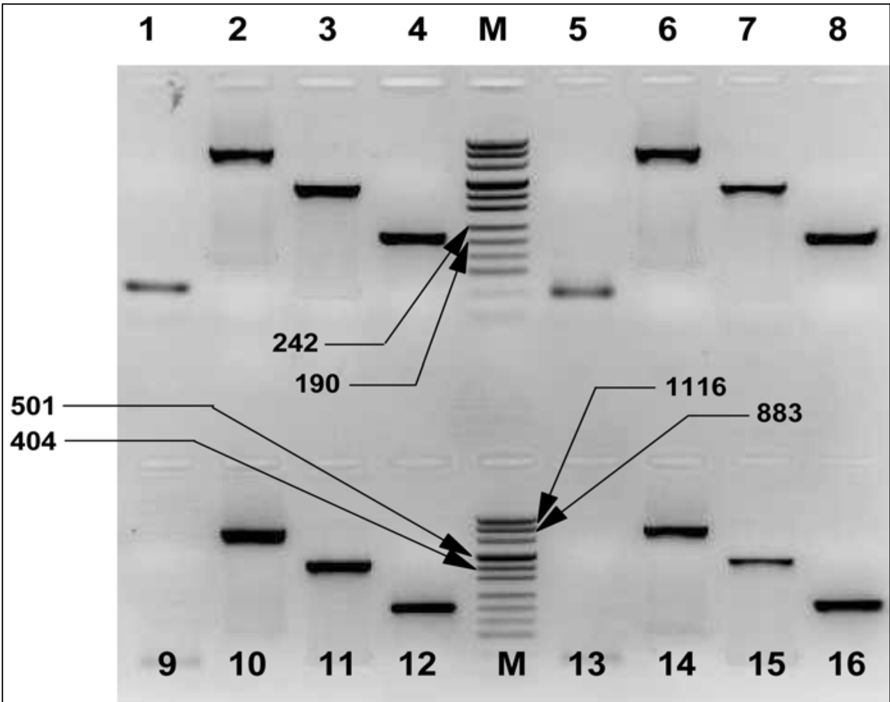


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР
Цифрами обозначены дорожки: М – маркер молекулярных весов ДНК Puc Mix Marker (стрелками обозначены длины фрагментов п.н.); 2, 3, 4 – полевой изолят M. haemolytica №1; 6, 7, 8 – полевой изолят *M. haemolytica* №2; 10, 11, 12 – культуральный штамм *Pasteurella haemolytica*; 14, 15, 16 – полевой изолят *M. haemolytica* №3; 1, 5, 9, 13 – вода (отрицательный контроль ПЦР).
2, 6, 10, 14 – продукт ПЦР гена lktD;
3, 7, 11, 15 – продукт ПЦР гена sodA;
4, 8, 12, 16 – продукт ПЦР гена lktC

M. haemolytica и дифференциации его от других представителей рода *Mannheimia* было выбрано и синтезировано 2 праймера для каждого гена (lktC, lktD и sodA) (см. таблицу). Расположения этих праймеров на геноме данного возбудителя представлены на рис. 1.

Для оптимизации условий постановки реакции использовали культуральный штамм №169 (серогруппа А) *Pasteurella haemolytica*.

В серии экспериментов были оптимизированы условия реакций: концентрация ионов магния, концентрация праймеров, температурные и временные режимы ПЦР. Ожидаемая длина фрагментов продукта амплификации составила 202 п.н. для гена lktC, 848 п.н. – гена lktD и 446 п.н – гена sodA.

Размеры продуктов в ПЦР и полученные

первичные структуры амплифицированных участков генома штамма №169 (серогруппа А) *Pasteurella haemolytica* соответствовали расчетным для *M. haemolytica* (рис. 2).

Для подтверждения специфичности разработанной методики ее проверили на материалах, содержащих гетерологичные микроорганизмы – *Pasteurella multocida, Chlamydophila pecorum, Mycoplasma, Salmonella, E. coli, Streptococcus, Haemophilus* и *Campylobacter*. При этом не наблюдалось неспецифической реакции, что подтверждает специфичность методики.

Аналитическую чувствительность метода определяли, используя серии десятикратных разведений культурального штамма №169 (серогруппа А) *Pasteurella haemolytica* с известным исходным титром (10^{10}КОЕ/мл). Было установлено, что ПЦР способна выявлять данный микроорганизм в концентрации 10^3 КОЕ/мл.

Хотя в ходе нашего исследования обоснованные праймеры не были предусмотрены для их совместного использования в ПЦР, мы оптимизировали условия ПЦР с использованием трех пар праймеров на генах lktC, lktD и sodA в одной реакции. Несмотря на то, что ПЦР могла выявлять геном *M. haemolytica* с этими тремя парами праймеров, резкое снижение чувствительности ПЦР не позволило нам использовать его в варианте мультиплекс.

С использованием разработанного метода было исследовано 35 проб патологического материала от КРС с респираторной клиникой. Из них геном *M. haemolytica* выявляли в 19 пробах и в трех случаях – *M. varigena*. Геном других представителей рода *Mannheimia* не был выявлен в исследуемых пробах.

Выводы

Таким образом, разработанная специфическая и чувствительная методика позволяет выявлять геном *M. haemolytica* в исследуемых пробах и дифференцировать его от других представителей рода *Mannheimia*.

РЕЗЮМЕ

Был разработан на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) и нуклеотидного секвенирования метод выявления генома *Mannheimia haemolytica* и дифференциации его от других представителей рода *Mannheimia*. С использованием разработанного метода было исследовано 35 проб патологического материала от КРС с респираторной клиникой. Геном *Mannheimia haemolytica* был выявлен в 19 случаях и в трех случаях - *Mannheimia varigena*.

SUMMARY

A method on the basis of the polymerase chain reaction (PCR) and nucleotide sequencing for detection of *Mannheimia* haemolytica genome and differentiation between other representatives of *Mannheimia* genus was developed. Thirty five samples from cattle with respiratory signs were tested by the developed method. The *Mannheimia haemolytica* genome was detected in 19 samples and *Mannheimia varigena* genome was shown in 3 samples.

Литература

1. Гамелин, О. Актуальность инфекционных респираторных заболеваний у крупного рогатого скота / О. Гамелин // Ветеринар. 2002. № 6. С. 9-12.
2. Rogers, E.R. Effects of Pasteurella haemolytica on Pulmonary Vascular Adrenergic Mechanisms: diss. / E.R. Rogers. Blackburd, Virginia, 2003. 203 p.
3. Мозгис, В. Я. Диарейные и респираторные заболевания телят, вызываемые условно – патогенными микроорганизмами / В. Я. Мозгис. – Рига: Зинатне,1993. 176 с.
4. Taxonomic relationships of the [Pasteurella] haemolytica complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of Mannheimia haemolytica gen. nov., comb. nov., Mannheimia granulomatis comb. nov., Mannheimia glucosida sp. nov., Mannheimia ruminalis sp. nov. and Mannheimia varigena sp. nov. / O. Angen, R. Mutters, D.A. Caugant [et al.] // Int. J. Syst. Bacteriol. 1999. Vol. 49. P. 67–86.
5. Zecchinon, L. How Mannheimia haemolytica defeats host defence through a kiss of death mechanism / L. Zecchinon, T. Fett, D. Desmecht // Vet. Res. 2005. Vol. 36. P. 133-156.
6. Ewers, C. Mannheimia haemolytica and the pathogenesis of enzootic bronchopneumonia / C. Ewers, A. Lьbke-Becker, L.H. Wieler // Berl. Munch. tierarztl. Wschr. 2004. Bd. 117, № 3-4. S. 97-115.
7. Jeyaseelan, S. Role of Mannheimia haemolytica leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis / S. Jeyaseelan, S. Sreevatsan, S. K. Maheswaran // Anim. Health Res. Rev.- 2002.- Vol. 3, № 2. P. 69-82.
8. Davies, R.L. Mosaic structure and molecular evolution of the leukotoxin operon (lktCABD) in Mannheimia (Pasteurella) haemolytica, Mannheimia glucosida, and Pasteurella trehalosi / R.L. Davies, S. Campbell, T.S. Whittam // J. Bacteriol. 2002. Vol. 184, № 1. P. 266-277.
9. Fodor, L. Coagglutination test for serotyping Pasteurella haemolytica / L. Fodor, Z. Pйnzes, J. Varga // J. Clin. Microbiol. 1996. Vol. 34, № 2. P. 393-397.
10. Highlander, S.K. Molecular genetic analysis of virulence in Mannheimia (pasteurella) haemolytica / S.K. Highlander // Front Biosci. 2001. Vol. 1, №6. P. 1128-1150.
11. McVicker, J.K. Isolation of immunogenic outer membrane proteins from Mannheimia haemolytica serotype 1 by use of selective extraction and immunoaffinity chromatography / J. K. McVicker, L.B. Tabatabai // Am. J. Vet. Res. 2002. Vol. 63, № 12. P. 1634-1640.
12. Evaluation of different methods for the detection of outer membrane proteins and lipopolysaccharides of Pasteurella haemolytica by immunoblotting / R.L. Davies, R. Parton, J.G. Coote [et al.] // J. Immunol. Methods. 1994. Vol. 167, № 1-2. P. 35-45.
13. tRNA-intergenic spacer PCR for the identification of Pasteurella and Mannheimia spp / B. Catry, M. Baele, G. Opsomer [et al.] // Vet. Microbiol. 2004. Vol. 98, № 3-4. P. 251-260.